

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 00/528



REC'D 18 MAY 2000
WIPO
PCT

4

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

09/914662

Herr Dr.rer.nat. Andreas Jordan in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe und
 Vorrichtung zur Aufbereitung von Gewebeproben“

am 10. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N und C 12 M der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 11. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

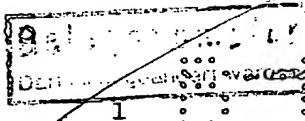
Der Präsident

Im Auftrag

Agurks

Aktenzeichen: 199 12 798.0





Beschreibung

Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus 5 Humangewebe und Vorrichtung zur Aufbereitung von Gewebeproben

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von
10 Krebszellen aus Humangewebe für naturwissenschaftliche,
vorzugsweise molekularbiologische und zellbiologische
Reihenuntersuchungen sowie ein Zellkulturmedium zur
Durchführung des Verfahrens und eine Vorrichtung zur
Aufarbeitung der Gewebeproben.

15

Für molekularbiologische Untersuchungen, vor allem mit
prädiktiver Intention, ist die Kultur von primären, aus
Feinnadel- und Stanzbiopsien gewonnenem Zellmaterial von
20 zentraler Bedeutung. Bei den bekannten Methoden ist
jedoch die „Angehrate“ der aus Humangewebe isolierten
Zellen sehr gering. Bei manchen Tumorarten ist eine
Zellkultivierung bisher nicht gelungen. Diese Problematik
ist zum einen dadurch begründet, daß die das Tumorgewebe
25 umgebenden Normalzellen und/oder die das Tumorgewebe
infiltrierenden Bindegewebszellen als erste wachsen und
so die Tumorzellen, die für die Untersuchungen gewonnen
werden sollen, überwachsen und am Wachstum hindern. Eine
erfolgreiche Kultivierung von Krebszellen wird darüber
30 hinaus durch vielfältige Kontaminationen, insbesondere
mit Bakterien oder Pilzen, verhindert.

Die bisher für die Kultivierung von Tumorzellen
35 verwendeten Zellkulturmedien, wie RPMI 1640, Basal Medium
Eagle, ISCOVE's, Medium 199, Leibovitz L-15. u.a., sind

2 0 0 0 0 0 0

nicht in der Lage, das Wachstum der Krebszellen in ausreichendem Maße zu fördern bzw. das der Normalzellen und bakteriellen Kontaminanten zu verhindern. Der bisher übliche unkontrollierte Einsatz von Antibiotika wirkt 5 zwar den negativen Einflüssen der Kontaminanten entgegen, behindert aber gleichzeitig das Wachstum der Tumorzellen.

Bei den bekannten Verfahren zur Kultivierung von 10 Krebszellen erfolgt die Aufbereitung der aus Feinnadel- oder Stanzbiopsien gewonnenen Gewebeproben durch eine mechanisch-enzymatische Gewebe-Disaggregation, bei der der heterogene, aus verschiedenen Schichten bestehende, 15 die Gewebeprobe bildende Stanzzyylinder durch eine Feinzerkleinerung als Ganzes in eine breiige Masse zerteilt und mit Hilfe von Enzymen in einzelne Zellen umgewandelt werden soll. Durch diese Feinzerkleinerung wird aber die heterogene Struktur der entnommenen 20 Gewebeprobe zerstört und es erfolgt eine intensive Vermischung der Tumorzellen mit den Normalzellen und Kontaminanten. Zum einen wird die Vitalität der Tumorzellen durch die Feinzerkleinerung beeinträchtigt. Andererseits ist durch die Zerstörung der Heterogenität 25 der Gewebeprobe der Probematerialbrei mit Normalzellen und Kontaminanten durchsetzt, so daß das Wachstum der Tumorzellen aus den oben genannten Gründen vermindert oder sogar vollständig verhindert wird. Bei dieser Art der mechanisch-enzymatischen Gewebe-Desaggregation des Gesamtmaterials sind Aussagen über die Struktur des 30 Tumors nicht möglich.

Bei den bisher bekannten Verfahren zur Vermehrung und Reinigung des aus einer Gewebeprobe gewonnenen 35 Tumormaterials wird die Zellvermehrung durch Transplantation des Tumormaterials auf eine Nacktmaus

vorgenommen (Xeno-Transplantat). Bei diesem Verfahren können zwar Angehraten des transplantierten Tumorgewebes von 50 % und gelegentlich auch mehr erreicht werden, jedoch vergehen - je nach Tumorart und Eigenschaften - mehrere Wochen oder gar Monate, ehe sich eine Zellvermehrung in vivo einstellt. Aufgrund des erheblichen Aufwands und der Zeitdauer haben Routinetests mit patientenindividuellen Primärzellen für eine Verlaufskontrolle und prädiktive Zwecke bisher nicht Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Aufgrund der langwierigen und oftmals vergeblichen Versuche zur Kultivierung des vom Patienten entnommenen Gewebematerials liegen die Testergebnisse viel zu spät vor, um in einem Routineverfahren aus den Versuchsergebnisse eine rechtzeitige Änderung des Therapieregimes vornehmen zu können. Neben dem hohen Zeitaufwand ist auch die erforderliche Durchführung von Tierversuchen und der hohe Kostenaufwand nachteilig.

20

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein von Tierversuchen unabhängiges Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebeproben anzugeben, das in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum von wenigen Tagen eine sichere Vermehrung von Tumorzellen aus einer Gewebeprobe gewährleistet und reproduzierbare Aussagen über die Struktur und die Malignität des Tumors sowie Wachstums- und Strukturänderungen oder therapeutische Effekte zuläßt. Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung einer auf dem Verfahren beruhenden Vorrichtung zur reproduzierbaren Aufbereitung von Gewebeproben sowie einem geeigneten Zellkulturmedium zur Vermehrung von Krebszellen in vitro.

35

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen gemäß den Merkmalen des Patentanspruchs I gelöst.

5

Der Grundgedanke der Erfahrung besteht dabei darin, daß die Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang in eine Mehrzahl separater Gewebesegmente aufgeteilt wird und somit die auf der Grundlage von Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe bzw. deren Heterogenität örtlich aufgelöst wird. Die Gewebesegmente werden dann jeweils separat weiter zerkleinert und die so gebildeten kleinen, separierten Gewebefragmente und -flüssigkeiten sowie die bei der sequentiell-parallelen Teilung der Gewebeprobe entstandene, ebenfalls jeweils separat gewonnene Gewebeflüssigkeit werden in einem spezifischen Zellkulturmedium und unter ausgewählten Kulturbedingungen kultiviert. Durch die örtliche Auflösung der Gewebeprobe werden die Einflüsse von in dieser vorhandenen Normalzellen, die bei üblicher - mechanischer oder enzymatischer - Aufbereitung der Gewebeprobe ein Überwachsen der Tumorzellen bewirken, ausgeschaltet oder zurückgedrängt. Gleichzeitig wird das Ausmaß von Kontaminationen, wie Pilze oder Bakterien, wesentlich reduziert bzw. erforderliche Antibiotika, die die Vermehrung von Tumorzellen bekanntermaßen stören, können sparsam und gezielt eingesetzt werden, ohne sich auf die Krebszellenkultivierung negativ auszuwirken.

30

Das vorgeschlagene Verfahren wird in weiterer Ausbildung der Erfahrung durch ein für sehr geringe Gewebemengen geeignetes Zellkulturmedium in der im Anspruch 8 wiedergegebenen Zusammensetzung sowie durch die im Anspruch 5 hinsichtlich der Sauerstoff- und

5 0 00-00-00

Kohlendioxidatmosphäre, der Luftfeuchte und der Temperatur sowie der Verwendung einer Biomatrix dargelegten Kultivierungsbedingungen vorteilhaft ergänzt. Insgesamt werden somit Bedingungen geschaffen, unter 5 denen das Wachstum der Krebszellen gefördert und das der Normalzellen und Kontaminanten wesentlich eingeschränkt oder sogar vollständig ausgeschaltet wird.

10 Weitere vorteilhafte Verfahrensmerkmale ergeben sich aus den Unteransprüchen. So wurde beispielsweise gefunden, daß die Tumorzellen in Anwesenheit von Erythrozyten, die unmittelbar von der Entnahmestelle der Gewebeprobe am Patienten stammen, besonders schnell wachsen und eine 15 höhere „Angehrate“ besitzen als Zellen, die nur im reinem Zellkulturmedium zum Wachstum gebracht werden. Darüber hinaus hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Gewebeprobe mindestens 2 Stunden, aber nicht länger als 24 Stunden, bei etwa 4°C bis 12°C in einem 20 Zellkulturmedium aufbewahrt wird, um bereits jetzt an das Zellkulturmedium, in dem später die Vermehrung der Krebszellen erfolgen soll, angepaßt zu werden. Unter den aufgeführten Verfahrensbedingungen ist eine Adhäsion der Tumorzellen aus den aufbereiteten Gewebefragmenten an 25 einer Biomatrix in der Zellkulturflasche bereits nach 1 bis 12 Stunden zu verzeichnen, sofern eine dem Gewebeentnahmeart identische Kulturtemperatur eingestellt wird.

30 Mit der vorliegenden und weiter unten in einem Ausführungsbeispiel detailliert beschriebenen Erfindung wird somit ein Verfahren zur Vermehrung von Tumorzeilen in vitro angegeben, mit dem in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum bei allen Tumorarten eine Kultivierung 35 von aus Humangewebe gewonnenen Zellen mit einer

„Angehrate“ von 100 % gelingt. Gegenüber der auf der Nacktmaus (Xeno-Transplantat) erzielten Zellvermehrung, bei der Angehraten von etwa 50 % erzielt werden, werden nicht nur Tierversuche vermieden und Kosten gespart, 5 sondern es ist auch eine drastische Verkürzung der für die Vermehrung des Zellmaterials benötigten Zeit zu verzeichnen, die gegenüber einem Zeitraum von mehreren Wochen oder gar Monaten beim Tumorwachstum *in vivo* bei dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Verfahren in der 10 Regel bei lediglich 1 - 10 Tagen liegt.

Dadurch ist es erstmals möglich, Routineuntersuchungen 15 für die Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen und für prädiktive Zwecke (Sensibilitätstest mit Strahlen, Chemotherapie, Hyperthermie) oder zur Früherkennung von Resistenzen zur Identifikation neuer Antikrebswirkstoffe, als Ergänzung für zytologische oder histopathologische 20 Gewebebefunde und in der Grundlagenforschung auf einfache und reproduzierbare Weise schnell und kostengünstig durchzuführen.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung ist zur 25 erfindungsgemäß ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe als entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Zellvermehrung eine Vorrichtung gemäß den Merkmalen des Anspruchs 9 vorgesehen. Diese Vorrichtung besteht zum einen aus einem Schneidapparat zum 30 sequentiell-parallelen Teilen der Gewebeprobe und zum anderen aus einem Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufarbeitung der mit dem Schneidapparat hergestellten Gewebesegmente. Bei den in diesen Vorrichtungen durchgeföhrten Schneidvorgängen werden die jeweiligen 35 Gewebestücke und -flüssigkeiten, die von verschiedenen Stellen der heterogenen Gewebeprobe stammen, voneinander

7 8

getrennt in der Vorrichtung gehalten und können somit selektiv für die Zellvermehrung eingesetzt werden.

5 Der Schneidapparat umfaßt im wesentlichen eine in Kammern eingeteilte Auffangschale mit einer auf dieser beweglich angebrachten Schneidplatte sowie einen Schneidmesserrahmen. In der Schneidplatte in vorgegebenen Abständen ausgebildete Schneidrinnen, die im
10 Schneidbereich zur Auffangschale hin offen sind, liegen jeweils oberhalb einer Kammer. Im Schneidmesserrahmen sind Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht, der mit dem zwischen den Schneidrinnen übereinstimmt. Durch das Schneiden der auf der
15 Schneidplatte liegenden Gewebeprobe jeweils im Bereich einer Schneidrinne wird ein sauberes Abtrennen der Gewebesegmente erreicht, und gleichzeitig gelangen Reststücke und Gewebeflüssigkeit in die unterhalb der Schneidrinne liegende Kammer.

20

Zur weiteren Aufbereitung der Gewebesegmente ist ein Zerkleinerungsgerät vorgesehen, das aus einer in Kammern geteilten Flüssigkeits-Auffangschale, einer auf dieser lösbar angebrachten Aufbereitungsplatte mit Vertiefungen zur Aufnahme der Gewebesegmente und einzelnen oder in einer Halteplatte drehbar und längsbeweglich angeordneten Drehstempeln mit an deren Stirnseite befestigten Messern besteht. Mit diesem Gerät werden die zur Zellvermehrung
25 letztlich eingesetzten kleinen Gewebefragmente erzeugt. Die gleichfalls verwendbare, bei dem Schneidvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit gelangt über in den Vertiefungen ausgebildete Löcher in die jeweils darunterliegende Kammer in der Flüssigkeits-Auffangschale
30 und wird ebenfalls zur Zellvermehrung verwendet.
35

Weitere Merkmale und vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung ergeben sich aus den übrigen Unteransprüchen.

5

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird nachfolgend beschrieben, wobei hinsichtlich der Zellvermehrung in vitro auf die beigefügte Tabelle, in der die 10 Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums wiedergegeben ist, und hinsichtlich der Aufarbeitung der Gewebeproben auf die beigefügte Zeichnung Bezug genommen wird. In der Zeichnung zeigen:

15

Fig. 1
eine auseinandergezogene perspektivische Ansicht einer Schneidvorrichtung zur erfindungsgemäßen sequentiell-parallelen Aufbereitung einer Gewebeprobe;

20

Fig. 2
eine auseinandergezogene perspektivische Darstellung einer Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der in der Vorrichtung nach Fig. 1 hergestellten Gewebesegmente für 25 die Zellvermehrung in vitro;

Fig. 3
eine Schnittansicht einer Auffangschale längs der Linie B-B in Fig. 1;

30

Fig. 4
einen senkrechten Schnitt durch eine Schneidplatte im Bereich einer Schneidrinne längs der Linie A-A in Figur 1; und

35

Fig. 5

eine Querschnittsansicht der Vorrichtung nach Fig. 2 in zusammengebautem Zustand.

5 Die vom Patienten in Form einer Feinnadel-bzw. Stanz-Biopsie entnommene Gewebeprobe liegt als Gewebestanzzyylinder vor, kann aber auch ein nach anderen Verfahren gewonnenes kleines Gewebefragment oder ein Gewebestück unterschiedlicher Form und Größe sein. Die 10 Gewebeprobe mit den an dieser haftenden, von der Entnahmestelle der Probe am Patienten stammenden Erythrozyten wird für den Transport zum Untersuchungsort in einem Zellkulturmedium bei Temperaturen zwischen 2°C und 12°C aufbewahrt, und zwar für einen Zeitraum von 15 mindestens 2 Stunden, maximal jedoch 24 Stunden. In diesem Zeitraum werden mechanische Belastungen des Gewebestücks vermieden. Das Gewebestück kann sich dabei bereits an das auch zur Zellvermehrung später benutzte Zellkulturmedium mit gleicher Zusammensetzung anpassen, 20 wobei die oben angegebenen Temperaturen besonders günstig sind.

25 Die Aufarbeitung der Gewebeprobe für die Zellkultivierung erfolgt mit den in der Zeichnung dargestellten Vorrichtungen.

30 Die Vorrichtung zum sequentiell-parallelen Teilen der Gewebeprobe in Abschnitte von bestimmter, vorgegebener Länge und zum Separieren dieser Abschnitte bzw. von Bestandteilen derselben umfaßt eine Auffangschale 1, eine auf der Auffangschale 1 gehaltene Schneidplatte 2 und einen Schneidmesserrahmen 3. Die Schneidplatte 2 ist in 35 fünf Abschnitte gleicher Breite eingeteilt. In jedem Abschnitt befinden sich jeweils in unterschiedlichem

Abstand angeordnete Schneidrinnen 4, die in ihrem mittleren Bereich zur Auffangsschale 1 hin offen sind. Die Schneidrinnen 4 sind in den fünf Abschnitten jeweils im Abstand von 1 mm, 2 mm, 3 mm, 5 mm und 1 mm angeordnet. In Längsrichtung der Schneidplatte ist in deren mittlerem Bereich eine aufgerauhte Auflagefläche 5 ausgebildet, um die darauf liegende Gewebeprobe 6 bei einem Schneidvorgang zu fixieren. In diesem Bereich sind die Schneidrinnen 4 nach unten offen. Die Schneidplatte 2 ist in zwei an den Längsseiten der Auffangschale 1 angebrachten Führungsschienen 7 verschiebbar gehalten. Die Schneidrinnen 4 in der Schneidplatte 2 setzen sich in Einschnitten 8 in den Führungsschienen fort.

Die Auffangschale 1 ist entsprechend den in der Schneidplatte 2 vorgesehenen Rinnenabschnitten durch Trennwände 12 in fünf Kammern 1a - 1e geteilt, wobei den Schneidrinnen durch weitere Zwischenwände in den betreffenden Kammern 1a, 1b, 1c und 1e jeweils Unterkammern 1a1 bis 1a9, 1b1 bis 1b4, 1c1 bis 1c3 und 1e1 bis 1e9 zugeordnet sind. Die Unterkammern sind zur exakten örtlichen Zuordnung der einzelnen Gewebeprobeselemente 6a oder Gewebeprobenreste bzw. Gewebeflüssigkeit entsprechend unterschiedlich markiert.

Der Schneidmesserrahmen 3 besteht aus einem Deckel oder Halterrahmen mit an dessen Deckplatte befestigten Schneidmessern 10. Anstelle der Schneidmesser 10 können zwischen den Rahmenseiten auch Schneiddrähte gespannt sein. Die Schneidmesser 10 sind im gleichen Abstand wie die Schneidrinnen 4 in der Schneidplatte angeordnet. Der Schneidmesserrahmen 3 ist so dimensioniert bzw. die Schneidelemente über bzw. in den Schneidrinnen 4 und

Einschnitten 8 hin- und herbewegt werden können. Der Schneidmesserrahmen 3 kann an einer Längsseite der Auffangschale 1 gelenkig befestigt sein, und zwar so, daß er in der auf der Schneidplatte 2 befindlichen Lage 5 dennoch quer zur Gewebeprobe bewegt werden kann, um die Probe an den Schnittstellen sauber zu durchtrennen.

In Abhängigkeit von der Länge der Gewebeprobe und dem gewünschten Schnittabstand wird die Gewebeprobe 6 auf die aufgerauhte Auflage 5 der Schneidplatte 2 gelegt. Durch Hin- und Herbewegen des auf die Gewebeprobe gelegten (geklappten) Schneidmesserrahmens 3 wird das Präparat im Bereich der Schneidrinnen 4 durchtrennt. Beim Schneiden 10 entstehende Flüssigkeit fließt über die im Bereich der Auflagefläche 5 der Schneidplatte 2 in den Schneidrinnen 15 4 vorgesehenen Öffnungen 4a in die jeweils darunter liegende Unterkammer. Die aufgefange Flüssigkeit kann ebenso für die Zellvermehrung genutzt werden wie die abgetrennten Probensegmente, die entweder auf der 20 Schneidplatte 2 liegenbleiben oder durch die Öffnung 4a in der Schneidrinne 4 in die darunterliegende Unterkammer fallen.

25 Mit der beschriebenen Vorrichtung gemäß den Figuren 1, 3 und 4 können in den vorgegebenen Abmessungen präzise und gleichmäßige sowie glatte Schnitte ohne Beschädigung des Probenmaterials reproduzierbar ausgeführt werden. Die 30 Zellvermehrung erfolgt somit aus einer entsprechend der Heterogenität des dem Patienten entnommenen Gewebestücks durch die Segmentierung örtlich aufgelösten Gewebeprobe. Dadurch wird der störende Einfluß von Normalzellen und Kontaminanten auf das Wachstum der Tumorzellen 35 zurückgedrängt bzw. ausgeschaltet (Selektion). Außerdem kann auch die beim Schneiden der Gewebeprobe

ortsaugelöst entstehende Gewebeflüssigkeit, die wichtige Stammzellen enthält, für die Zellvermehrung genutzt werden. Im Ergebnis der sich an die unten beschriebene weitere Aufbereitung der Gewebeprobe anschließenden

5 Zellvermehrung in vitro können Aussagen über die Struktur der heterogen ausgebildeten Gewebeprobe, über die Anordnung des Tumorkerns oder die Malignität getroffen werden. Schließlich ist die Herstellung der Probensegmente mit der jeweiligen Ortsauflösung auch
10 reproduzierbar, so daß verlässliche Aussagen über den Verlauf der Erkrankung oder die Wirkung therapeutischer Maßnahmen getroffen werden können.

15 In einer Ausführungsvariante der oben beschriebenen Schneidvorrichtung kann das Durchtrennen der Gewebeprobe auch mit einem separaten Messerstempel (nicht dargestellt) erfolgen, an dem die Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht sind, der mit 20 dem zwischen den Schneidrinnen 4 übereinstimmt.

In den Figuren 2 und 5 ist eine Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der ortsaugelöst zur Verfügung gestellten
25 Probensegmente 6a oder von Reststücken wiedergegeben. Bei dieser Vorrichtung ist eine Flüssigkeits-Auffangschale 13 durch senkrechte Trennwände 11 in mehrere Kammern 13a bis 13e aufgeteilt. In zwei am oberen Rand der Flüssigkeits-Auffangschale 13 gegenüberliegend angebrachten
30 Führungsschienen 14 ist eine Aufbereitungsplatte 15 mit in dieser im Abstand eingeformten Vertiefungen 16 gehalten. Die Vertiefungen 16 weisen am Boden kleine Löcher 17 auf. In der in die Führungsschienen 14 vollständig eingeschobenen Lage der Aufbereitungsplatte 35 15 liegen die Vertiefungen 16 jeweils über einer Kammer 13a bis 13e. Die zuvor abgetrennten Probensegmente 6a der

Gewebeprobe 6 werden in die Vertiefungen 16 gelegt und mit an einem Drehstempel 18 befestigten Drehstempelmesser 19 weiter zerkleinert. Vorzugsweise sind 2 oder mehrere Drehstempelmesser 19 an der Stirnseite des Drehstempels 5 angeordnet. Das Zerkleinern der Probensegmente 6a erfolgt bei leichtem Druck und gegebenenfalls gleichzeitigem Hin- und Herdrehen des Drehstempels 18.

10 Wie Fig. 2 zeigt, können auch mehrere Drehstempel 18 in einer Halteplatte 20 drehbeweglich und heb- und senkbar gehalten sein. Der Abstand zwischen den Drehstempeln 18 entspricht dem der Vertiefungen 16 in der Aufbereitungsplatte 15.

15

Nach der weiteren Teilung der Probensegmente 6a stehen deren Teilstücke (Gewebefragmente) und die bei diesem Trennvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit, die über die Löcher 17 in den Vertiefungen 16 in die Kammern 13a bis 20 13e gelangt, für die Zellvermehrung zur Verfügung.

25 Die in den Figuren 1 bis 5 dargestellten Vorrichtungen zum ortsaufgelösten, sequentiell-parallelen Schneiden und weiteren Aufbereiten der Gewebeprobe bestehen aus einem bis 121°C beständigen, zur Behandlung im Autoklav geeigneten Material, vorzugsweise Teflon, Metall oder Plastik. Für die Schneidmesser wird vorzugsweise Glas 30 verwendet.

35 Die einzelnen Teilstücke und die jeweilige Gewebeflüssigkeit der ortsaufgelöst hergestellten Probensegmente 6a werden nun separat in einzelne, mit dem gleichen Zellkulturmedium, in dem sich bereits die dem

Patienten entnommene Gewebeprobe 6 befand, gefüllte Zellkulturflaschen eingebracht. Das verbleibende Zellkulturmedium, in dem die Gewebeprobe nach der Probenahme aufbewahrt wurde, wird ebenfalls in eine Zellkulturflasche gefüllt. Die Zellkulturflaschen sind jeweils mit einer Biomatrix, hier Collagen oder Polylysin beschichtet. Die Zusammensetzung des hier für die Zellvermehrung *in vitro* eingesetzten Zellkulturmediums ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben:

10.

Anorganische Salze

	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	50 mg/L
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	132 mg/L
	Kcl	400 mg/L
15	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	150 mg/L
	NaCl	6400 mg/L
	NaHCO_3	2100 mg/L
	Na_2HPO_4	400 mg/L

20

Aminosäuren

	L-Arginin $\circ 4 \text{ HCl}$	110 mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	38 mg/L
	L-Asparaginsäure	23 mg/L
25	L-Cystin	31 mg/L
	L-Glutaminsäure	25 mg/L
	L-Glutamin	296 mg/L
	Glycin	13 mg/L
	L-Histidin (freie Base)	12 mg/L
30	L-Hydroxyprolin	10 mg/L
	L-Isoleucin	38 mg/L
	L-Leucin	38 mg/L
	L-Lysin $\circ \text{HCl}$	35 mg/L
	L-Methionin	12 mg/L
35	L-Phenylalanin	16 mg/L
	L-Prolin	22 mg/L

15 0 10 00 00 00

16

	L-Serin	26 mg/L
	L-Threonin	22 mg/L
	L-Tryptophan	5 mg/L
	L-Tyrosin	19 mg/L
5	L-Valin	22 mg/L
	L-Alanin	10 mg/L

Vitamine

	Biotin	0,6 mg/L
10	D-Ca-Pantothenat	0,7 mg/L
	Cholinchlorid	3,5 mg/L
	Folsäure	1,0 mg/L
	i-Inositol	35,9 mg/L
	Nicotinamid	1,0 mg/L
15	Pyridoxal o HCl	1,0 mg/L
	Riboflavin	20 µg/L
	Thiamin o HCl	1,0 mg/L
	Para-Aminobenzoësäure	500 µg/L
	Vitamin B ₁₂	5 µg/L
20	Niacin	25 µg/L
	Ascorbinsäure	50 µg/L
	Folinsäure	6 µg/L
	Liponsäure	21 µg/L
	Vitamin A (Acetat)	100 µg/L
25	Pyridoxin o HCl	25 µg/L
	Niacinamid	25 µg/L
	α-Tocopherolphosphat	10 µg/L

30 **Weitere Komponenten**

	D-Glucose	1750 mg/L
	Phenolrot	7 mg/L
	Glutathion (reduziert)	0,5 mg/L
	Na-Pyrovat	1 mM

35 **Epidermaler Wachstumsfaktor**

(Epidermal Growth Factor, EGF-

rekombinant 250 ng/L
Fötale Rinderserum (FBS) 12,5 %
Insulin vom Rind (Lyophilisat) 8 mg/L (26 U/mg)

5 Antibiotika nach Stand der Technik.

Die mit einer Biomatrix beschichteten Zellkulturflaschen mit dem erfindungsgemäßen Zellkulturmedium und den in 10 diesem befindlichen, nach dem zuvor beschriebenen Aufbereitungsverfahren hergestellten kleinen Gewebefragmenten bzw. der Gewebeflüssigkeit werden anschließend in einen Brutschrank eingebracht und dort bei einer Temperatur zwischen 30°C und 36,5°C, einer 15 Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 %, einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 bis 5 % und einer Luftfeuchte von 100 % aufbewahrt. Die genaue Temperatur richtet sich nach der Temperatur, die bei der Entnahme der Gewebeprobe gemessen wurde.

20

Bereits nach 1 bis 12 Stunden erfolgt eine Adhäsion der Tumorzellen an das Biomatrixsubstrat in der Zellkulturflasche. Etwa 24 Stunden nach der 25 Erstetablierung der Kultur wird nach erfolgter Zelladhäsion das in den Zellkulturflaschen befindliche Medium gegen ein frisches Zellkulturmedium, das die gleiche Zusammensetzung wie das erste aufweist, ausgetauscht. Weitere Medienwechsel werden - je nach 30 Präsenz von Kontaminanten - in der ersten Woche durchgeführt. Nachdem die Tumorzellen nach einer Ruhephase etabliert sind und sich vermehren, werden sie in einem von Antibiotika freien Medium gehalten. Daraufhin wird die Massenvermehrung initiiert.

35

Durch die oben beschriebene frühzeitige Teilung der Gewebeprobe nach 2 bis 24 Stunden in separate Gewebesegmente bzw. noch kleinere Gewebefragmente ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination und einer

5 Massenvermehrung von Kontaminanten in den Kulturflaschen gering. Dennoch vereinzelt aufgefundene Kulturflaschen mit hoher Kontaminationsbelastung werden verworfen. Bei einer durch technische Fehler bedingten starken Vermehrung von Normalzellen, die zu einem Überwachsen der 10 Tumorzellen führen, kann auch eine Magnetseparation durchgeführt werden, woraufhin unter den oben angegebenen Kulturbedingungen ein selektives Wachstum der malignen Zellen gewährleistet ist.

15

20

25

30

35

Patentansprüche

5 1. Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe für molekularbiologische Reihenuntersuchungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Gewebeprobe (6) auf der Grundlage ihrer heterogenen Struktur in bezug auf Tumorzellen,
10 Normalzellen und Kontaminanten durch eine sequentiell-parallele Teilung in Scheibensegmente örtlich aufgelöst wird und die einzelnen Gewebeprobensegmente separiert und weiter in Gewebefragmente geteilt werden und die gewonnenen
15 kleinen, separierten Gewebefragmente und Gewebeflüssigkeiten der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a) in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen selektiv zum Wachstum gebracht werden.

20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe aus Feinnadel-, Aspirations- und intraoperativem Biopsien oder einer Resektatprobe gewonnen wird und zusammen mit den an der Gewebeprobe haftenden Erythrozyten aus dem Bereich der Entnahmestelle der Probe an dem betreffenden Patienten vorübergehend in ein Zellkulturmedium eingebacht wird.

25 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium zur zwischenzeitlichen Aufbewahrung der frischen Gewebeprobe mit dem Vermehrung der Tumorzellen vorgesehenen Zellkulturmedium identisch ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe (6) zur Anpassung an das Zellkulturmedium in diesem mindestens 2 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 4°C und 12°C verbleibt.

5

10

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die aus den ortsaufgelösten Gewebeprobensegmenten (6a) erzeugten Gewebefragmente und -flüssigkeiten separat in mit einer Biomatrix beschichteten und mit dem Zellkulturmedium gefüllten Zellkulturflaschen unter einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 % und einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 - 5 % sowie bei einer Luftfeuchte von 100 % und Temperaturen zwischen 30°C und 36,5°C kultiviert werden.

15

20

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Zeit nach der Erstetablierung der Kultur und erfolgter Zelladhäsion das Zellkulturmedium in der Kulturflasche gegen ein neues, jedoch mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird.

25

7. ~~Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,~~

30

daß das Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Präsenz von Kontaminanten, wie Bakterien oder Pilze, bei gleichbleibendem oder verringertem Anteil an Antibiotika ausgetauscht wird.

3 8 10000-000

21

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium aus anorganischen Salzen, nämlich

5	Ca (NO ₃) ₂	10-100	mg/L
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	80-150	mg/L
	KCl	200-1000	mg/L
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	200-700	mg/L
	NaCl	3000-10000	mg/L
10	NaHCO ₃	1500-4000	mg/L
	Na ₂ HPO ₄	100-1000	mg/L;

Aminosäuren, nämlich

15	L-Arginin • 4 HCl	10-500	mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Asparaginsäure	10-500	mg/L
	L-Cystin	10-500	mg/L
20	L-Glutaminsäure	10-500	mg/L
	L-Glutamin	10-500	mg/L
	Glycin	10-500	mg/L
	L-Histidin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Hydroxyprolin	10-500	mg/L
25	L-Isoleucin	10-500	mg/L
	L-Leucin	10-500	mg/L
	L-Lysin • HCL	10-500	mg/L
	L-Methionin	10-500	mg/L
	L-Phenylalanin	10-500	mg/L
30	L-Prolin	10-500	mg/L
	L-Serin	10-500	mg/L
	L-Threonin	10-500	mg/L
	L-Tryptophan	10-400	mg/L
	L-Tyrosin	10-500	mg/L
35	L-Valin	10-500	mg/L
	L-Alanin	10-300	mg/L

4 0 1000 000

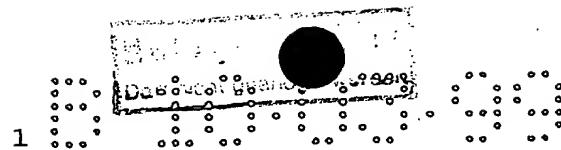
22

Vitaminen, nämlich

	Biotin	0,01-10	mg/L
5	D-Ca-Pantothenat	0,01-10	mg/L
	Cholinchlorid	0,1-50	mg/L
	Folsäure	0,01-10	mg/L
	i-Inositol	0,1-100	mg/L
	Nicotinamid	0,01-10	mg/L
10	Pyridoxal o HCL	0,01-10	mg/L
	Riboflavin	0,1-100	μg/L
	Thiamin o HCL	0,1-50	mg/L
	Para-Aminobenzoesäure	1-1000	μg/L
	Vitamin B ₁₂	1-1000	μg/L
15	Niacin	1-100	μg/L
	Ascorbinsäure	1-5000	μg/L
	Folinsäure	1-100	μg/L
	Liponsäure	1-100	μg/L
	Vitamin A (Acetat)	10-1000	μg/L
20	Pyridoxin o HCl	1-100	μg/L
	Niacinamid	1-100	μg/L
	α-Tocopherolphosphat	0-1000	μg/L

sowie

25	D-Glucose	100-5000	mg/L
	Phenolrot	0,1-1000	mg/L
	Glutathion (reduziert)	0,01-10	mg/L
	Na-Pyruvat	0,1-50	nM
30	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF) -rekombinant	1-3000	ng/L
	Fötales Rinderserum (FBS)		
	Insulin vom Rind (Lyophilisat)	0,1-50	mg/L
35	und Antibiotika zusammengesetzt ist.		



Bezugszeichenliste

1	Auffangschale
5	1a1 bis 1a10 Unterkammern
	1b1 bis 1b5 Unterkammern
	1c1 bis 1c3 Unterkammern
	1d
	1e1 bis 1e10 Unterkammern
10	2 Schneidplatte
	3 Schneidmesserrahmen
	4 Schneidrinnen
	4a Öffnung in 4
	5 Auflagefläche
15	6 Gewebeprobe
	6a Probensegment
	7 Führungsschiene
	8 Einschnitte
	10 Schneidmesser/Schneiddrähte
20	11 Trennwand
	12 Trennwand
	13 Flüssigkeitsauffangschale
	13a bis 13e Kammern
	14 Führungsschienen
25	15 Aufbereitungsplatte
	16 Vertiefungen
	17 Löcher
	18 Drehstempel
	19 Drehstempelmesser
30	20 Drehstempel-Halteplatte

5 0 0 0 0 0 0 0 0 0

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, zur ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe, gekennzeichnet durch einen Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Zerteilen der Gewebeprobe (6) in einzelne, voneinander getrennte Gewebesegmente (6a) und der entsprechenden Schnittstelle zugehöriger Gewebeflüssigkeit, bestehend aus einer in Kammern mit Unterkammern (1a1 bis 1a10, 1b1 bis 1b5, 1c1 bis 1c3, 1d und 1e1 bis 1e10) aufgeteilten Auffangschale (1), einer auf dieser lösbar gehaltenen Schneidplatte (2) mit zur Auffangschale (1) hin teilweise offenen Schneidrinnen (4) sowie einem Schneidmesserrahmen (3) für Schneidmesser (10), wobei die Anordnung der Schneidmesser (10) im Schneidmesserrahmen (3) mit der Schneidrinnen (4) in der Schneidplatte (2) übereinstimmt und jeder Schneidrinne (4) eine sich unter dieser befindenden einzelnen Unterkammer zugeordnet ist; sowie ein Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a), die eine in Kammern (13a bis 13e) aufgeteilte Flüssigkeits-Auffangschale (13), eine auf dieser lösbar angebrachte Aufbereitungsplatte (15) mit Vertiefungen (16) sowie Drehstempel (18) mit Drehstempelmessern (19) umfaßt, wobei die Vertiefungen (16) Löcher (17) aufweisen und sich jeweils oberhalb einer Kammer (13a bis 13e) befinden und die Drehstempel (18) den Vertiefungen (16) zugeordnet sind.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) eine senkrecht zu den Schneidrinnen (4) verlaufende und mittig angeordnete

6 10:03:00

75

aufgerauhte Auflagefläche (5) zur stabilen Lagerung der Gewebeprobe (6) aufweist.

5 11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidrinnen (4) im Bereich der Auflagefläche (5) zu der darunterliegenden Unterkammer hin offen sind, so daß beim Schneiden gebildete Gewebeflüssigkeit oder Gewebestücke
10 getrennt in der jeweiligen Unterkammer aufgefangen werden.

15 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Breite der Schneidrinnen (4) größer als die Stärke der Schneidmesser (10) ist.

20 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) an einer Deckplatte des Schneidmesserrahmens (3) befestigt sind.

25 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) in dem Schneidmesserrahmen (3) verspannte Schneiddrähte bilden.

30 15. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) und die Aufbereitungsplatte (15) jeweils in Führungsschienen (7 bzw. 14) an der Auffangsschale (1) bzw. der Flüssigkeits-Auffangschale (13) gehalten sind, wobei in den

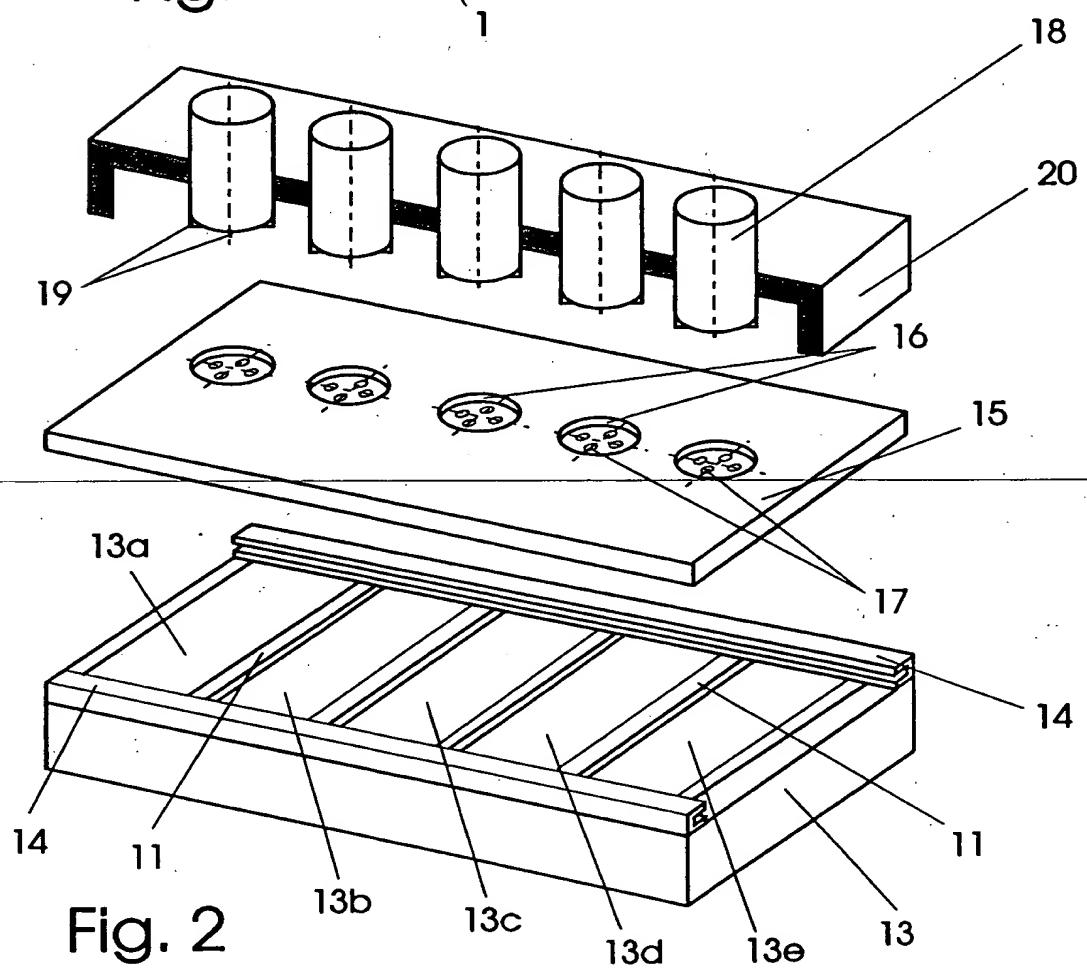
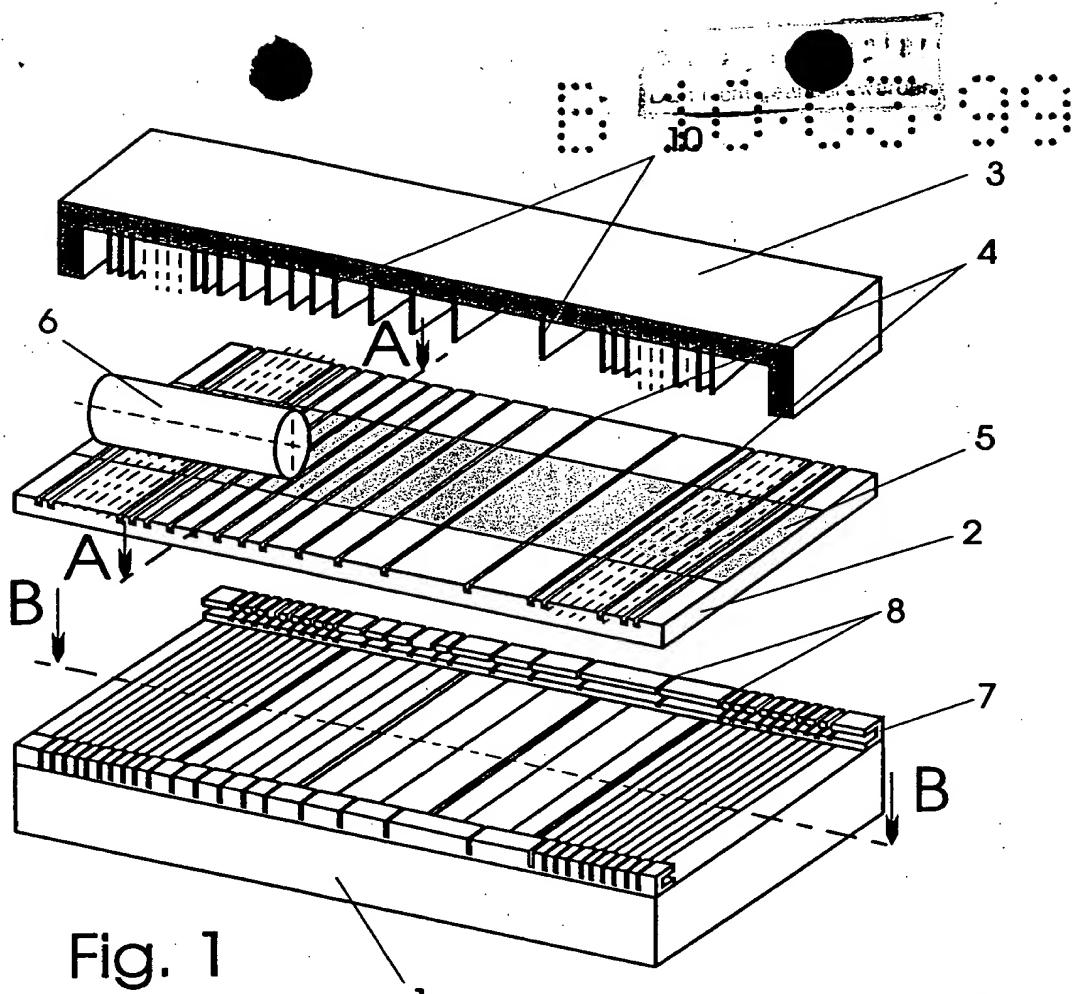
7 8 10 00 99

Führungsschienen (7) für die Schneidplatte (2) mit den Schneidrinnen (4) fluchtende Einschnitte (8) ausgebildet sind.

5

16. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Drehstempel (18) in Bohrungen einer Drehstempel-Halteplatte (20) in senkrechter Richtung bewegbar sowie drehbar angeordnet sind.

10



96/3084574
Daten
ausgewertet werden.
6.10.1999

78

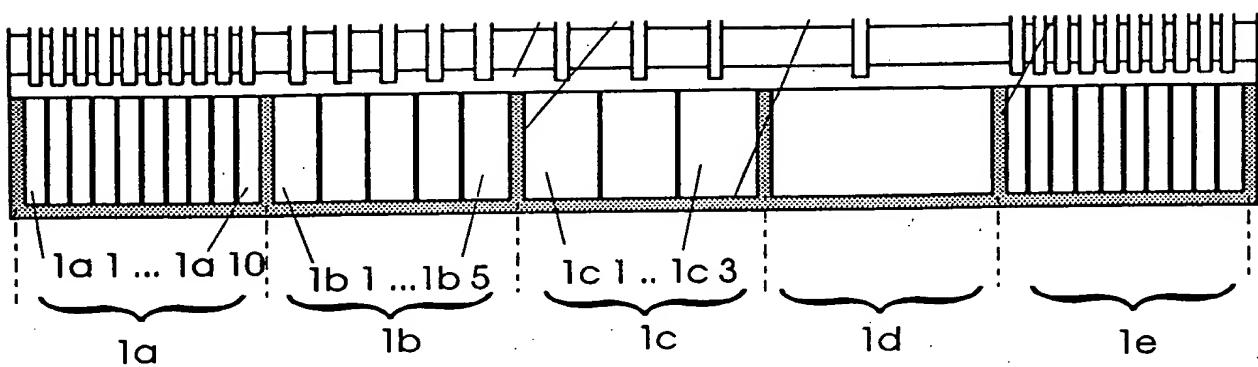


Fig. 3

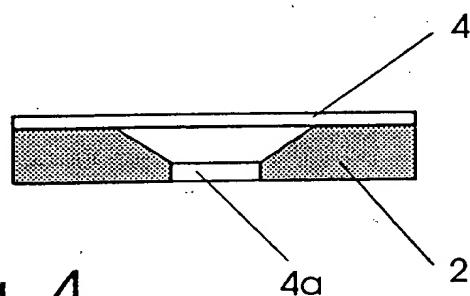


Fig. 4

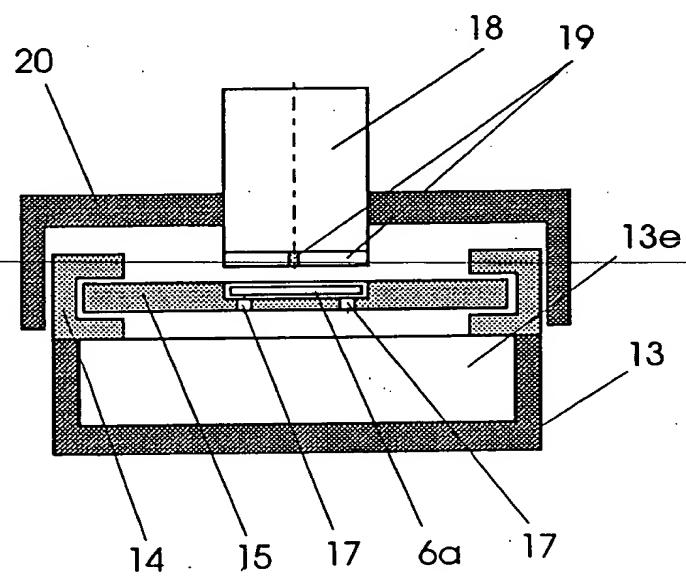


Fig. 5